

可溶化型T細胞レセプター

天野 麻穂・上野川 修一

The Soluble Type of T Cell Receptor

Maho AMANO and Shuichi KAMINOGAWA

Cellular immunity is mediated by the interaction of a T cell receptor (TCR) with a peptide presented within the context of a major histocompatibility complex (MHC) molecule. In order to clarify the detailed mechanism of allergy and autoimmunity, it is critical to define the system of TCR recognition to its ligand, antigenic peptide and MHC complex (pMHC) at the molecular level. Analyses of the physico-chemical properties and structure of TCR interacting with pMHC are necessary to answer this question. Since TCR is a membrane-bound protein, it is difficult to apply these analyses to intact TCR molecules. Therefore a soluble type of TCR (sTCR) is necessary for this purpose. sTCR is also expected to be useful to identify the antigen presenting region in intestine or thereabouts for orally administrated food allergen. From a clinical viewpoint, sTCR would be applicable to treatment of diseases caused by pathogenic T cell responses specific for a certain antigen, such as autoimmune diseases and allergies. In this review, we will introduce and discuss the recent topics including our study of sTCR.

Key words: T cell receptor (T細胞レセプター), major histocompatibility complex (主要組織適合遺伝子複合体), allergy (アレルギー), autoimmunity (自己免疫疾患), membrane-bound protein (膜結合型タンパク質)

1. 緒 言

生体は常に、外界に存在する様々な微生物やウイルス、毒素などに曝されている。免疫系は、これらの外来侵入物や感染細胞、腫瘍細胞等を排除し、生体の恒常性を維持するために高等動物が持つシステムである。

近年、アレルギーが社会的な問題ともなっているが、これは食餌抗原や花粉など、全ての外来侵入物を「非自己」として認識し、免疫系が過剰に応答してしまう結果生じるものである。また、難治性の関節リュウマチは、免疫系が本来攻撃するべきでない「自己」に対して応答し傷害を与えてしまう自己免疫疾患であり、後天性免疫不全症候群は、HIVが免疫系を破壊して、「非自己」である細菌などの外来異物を排除できなくなるために発症する疾患である。

これらの疾患の有効な治療や予防のためには、免疫系の機構を詳細に解明することが必要である。

免疫系には様々な細胞集団が存在し、それぞれの役割を担っているが、中でもT細胞は、外来の異物や感染した自己の細胞を「非自己」として認識し、それを排除するために、他の細胞集団の機能を制御する細胞であり、免疫反応において重要な役目を果たすことが知られている。

T細胞が細胞表面に発現しているT細胞レセプター (T cell receptor; TCR) は、無限に近い多様な外来の異物を「非自己」と認識し、T細胞にその情報を伝える上で中心的な役割を担っている膜結合型タンパク質である。抗体と類似した構造をもち、N末端には可変 (Variable; V) 領域、C末端に定常 (Constant; C) 領域があり、遺伝子の再構成によって大きな多様性を示す。抗体が2本の軽鎖と重鎖か

ら成るのに対し、TCRはほぼ同じ大きさの2つの異なるサブユニットから形成されるヘテロ二量体である。TCRを形成するサブユニットには α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖、 δ 鎖の4種類が存在するが、95%以上のT細胞は α 鎖と β 鎖から成るTCRを、残りの5%のT細胞は γ 鎖と δ 鎖から成るTCRを発現しており、 α 鎖と β 鎖、およびほとんどの γ 鎖と δ 鎖は、抗体の場合と同様、1カ所のジスルフィド結合を介して二量体を形成している¹⁾。 α 鎖、 β 鎖の場合は、いずれも分子量40~50kDaの糖タンパク質である。膜貫通ドメインにあるヘリックス構造の中には正に荷電したアミノ酸が存在するが、これは一般の膜結合型タンパク質の場合とは異なり、TCRに特徴的である。この膜貫通ドメインを介し、C末端の2-7アミノ酸残基が細胞内に存在している。また、 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体では、N-グリコシル化される可能性のある部位は7カ所存在しており、この点はN-グリコシル化がほとんどなされていない抗体分子とは大きく異なる²⁾。

T細胞が活性化され、機能するようになるまでの過程は、以下の通りである。抗原は生体内に取り込まれると、抗原提示細胞内で変性やタンパク質分解酵素による消化を受け、ペプチド断片に分解される。このペプチド断片は、主要組織適合遺伝子複合体 (Major histocompatibility complex; MHC) の遺伝子産物であるMHC分子と結合し、複合体として抗原提示細胞上に提示される³⁾。MHC分子には、大別してクラスI分子とクラスII分子の2種類が存在しており、クラスI分子は細胞内で合成された抗原の提示に関与し、クラスII分子は細胞外由来抗原の提示に関与している。従って、アレルギーにはクラスII分子が関与しているといえる。T細胞はTCRを介して、抗原提示細胞上に抗原提示された抗原ペプチドとMHC分子の複合体 (pMHC) を認識することで、はじめて活性化を受け、下流の免疫反応を制御できるようになる (図1)。つまり、TCR/pMHC相互作用は、免疫系の抗原認識、すなわち免疫系による「自己」と「非自己」の認識を左右する、免疫系で最も重要な分子間相互作用であり、それを制御することで様々な疾患の治療や予防への応用も期待

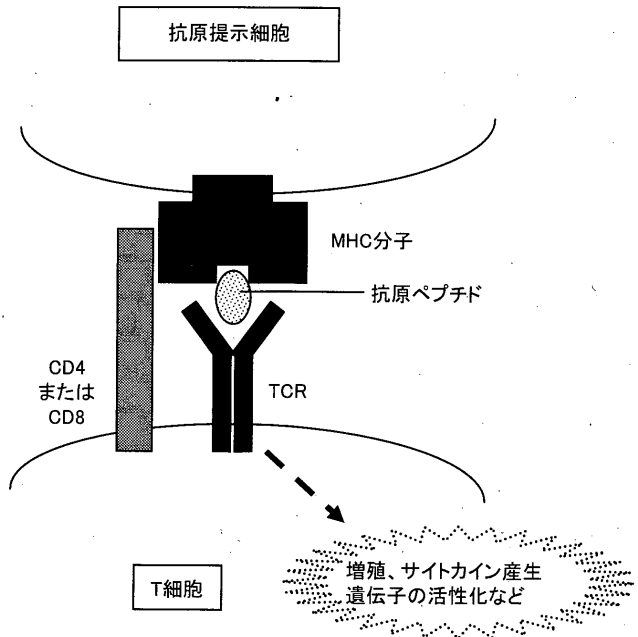


図1 T細胞レセプター、抗原、抗原提示細胞の相互作用

できる。そのためには、TCR/pMHCの詳細な相互作用の機構を分子レベルで解明することが重要である。特に、TCR/pMHCの立体構造解析や、解離速度や親和定数の算出など、相互作用の物理化学的側面からの解析が、TCRによるpMHCの認識機構、ひいては免疫系の抗原認識機構の解明に必要であると考えられる。

しかし、上述したように、TCRはT細胞表面上に発現する膜結合型タンパク質であるので、そのままでは可溶性分子として発現することはない。従って、立体構造解析はもちろん、表面プラスモン共鳴を用いたリガンドとの相互作用の解析などにTCRをそのまま適用することは困難である。そのために、抗原/抗体相互作用の場合と比べて、TCR/pMHCに関するこれらの物理化学的解析は立ち後れてきた。これらの解析は、TCRを安定な可溶性分子として発現させることで比較的容易となる。つまり、TCR/pMHC相互作用解析を行う上で、可溶化型TCR (soluble TCR; sTCR) は非常に有用なツールである。さらに、sTCRは特異的なpMHCを検出するためにも有効である。ある特定のpMHCを特異的に認識する抗体を作製することは非常に困難であるため、生体内においてある特定のpMHCだけを

特異的に検出することは容易ではない。特に、食品抗原の場合、抗原を標識して経口投与するという方法では、生体内でタンパク質の分解を受けてしまうため、生体内での抗原の動向を追うことが困難である。したがって、食品抗原が生体内に取り込まれた後、腸管内のあるいはそれ以外のどの部位で、どのような細胞により抗原提示が行われるのかが未だに明らかにされておらず、このことが食品アレルギー発症の機構解明を遅らせていると言っても過言ではない。sTCRのpMHCに対する特異性を利用することにより、経口摂取された抗原が提示される部位や細胞の同定が可能となり、このことを通じて、食品抗原に対する免疫応答機構の解明や、アレルギー、自己免疫疾患などへの治療・予防法の開発に貢献するものと期待される。

2. sTCRのデザイン

sTCRの発現系を構築する上で問題となるのが、以下の2点である。すなわち、膜タンパク質であるTCRを可溶化型タンパク質として発現させると、 α 鎖と β 鎖、および γ 鎖と δ 鎖のヘテロ二量体タンパク質として発現させることである。

前者の問題点を回避するために、大腸菌で封入体として発現させた後、精製段階において可溶化を行ったり⁴⁾⁻⁷⁾、あるいは、動物細胞を用いて発現させた場合は、タンパク質のC末端側にシグナルペプチドを付加して分泌発現を行う⁸⁾⁻¹¹⁾、などの工夫を為すことが多い。また、後者の問題点を改善すべく、これまでにいくつかの発現系でsTCRの調製が試みられているので、ここではそれを紹介したい。

2-1. 一本鎖sTCR

ヘテロ二量体化の問題をクリアするため、 α 鎖のC領域（あるいはその一部）と β 鎖のC領域（あるいはその一部）を、アミノ酸数残基から成るリンカーを介して直結させた一つのタンパク質として発現させたものである。このような形で発現させても、TCRのV領域が有する抗原ペプチドに対するアフィニティは影響を受けないと考えられることから、TCR/pMHC相互作用における親和定数の算出などに利用されている⁴⁾⁻⁶⁾。

ごく最近、Gakamskyらにより、興味深い報告がなされた¹¹⁾。MHCクラスI分子であるH-2K^d拘束性で、*Plasmodium berghei* circumsporozoite proteinの252-260残基に特異的なsTCRを作製し、表面プラスモン共鳴法によりTCR/pMHCの結合速度および解離速度を求めたところ、TCRとpMHCの結合は従来の可逆的な一段階反応では説明がつかないという結果が得られたのである。彼らは、新しい結合メカニズムとして、「TCRがpMHCと結合して、中間体的なTCR/pMHC複合体であるTCR/pMHC^{int}を形成後、さらにコンフォメーションを変化させて、より安定性の高いTCR/pMHCstに変化する。つまり、二段階の反応を経るinduced-fitメカニズム」か、あるいは「TCRには2つのコンフォメーションがあり、pMHCと結合するに際して、より安定なコンフォメーションに変化した後、TCR/pMHCを形成するpreequilibriumメカニズム」の2つを提唱しているが、今後、異なるTCRとpMHCの組み合わせにより同様の実験を行い、どのような結論が得られるか、結果が待たれるところである。

また最近では、yeast surface displayを利用した発現系も報告されており、sTCR変異体を容易に作製、発現させることが可能なので、この長所を活かした研究に利用されている。すなわち、点特異的変異によりTCRの各部位のもつ機能をアミノ酸一残基単位で同定したり、将来的に医学方面への応用を期待して、特異的なpMHCに対して天然に存在するTCRよりもさらに高いアフィニティをもつsTCRのスクリーニングなどが行われている¹²⁾⁻¹³⁾。

2-2. ヘテロ二量体sTCR

最も代表的なものが、Changらにより開発された、c-Junとv-Fosのロイシンジッパーを利用したものであり⁶⁾⁻⁸⁾、この方法では次のような特徴を活かしてヘテロ二量体の発現が従来の他の発現系に比べて比較的容易となっていると考えられる。すなわち、 α 鎖および β 鎖を別々のタンパク質として発現させ、各タンパク質の細胞外ドメインに、c-Junの塩基性アミノ酸に富むペプチド、およびv-fosの酸性アミノ酸に富むペプチドをそれぞれ接続することによっ

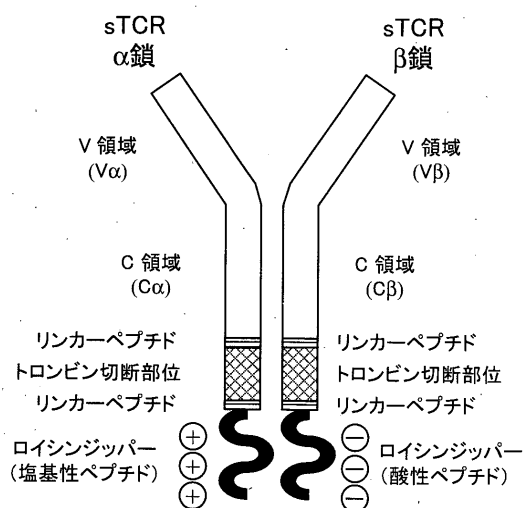


図2 ロイシンジッパー法を利用したsTCR概念図

て、 α 鎖および β 鎖が静電的相互作用により会合するようになり、ホモ二量体の形成を抑えることが出来るのである(図2)。このようにして発現させたsTCRは、その立体構造から、天然のTCRときわめて類似した性質を持つと考えられる。

特に、哺乳動物細胞を用いて発現させた場合などは、sTCRの糖鎖や脂肪酸の付加、リン酸化などの翻訳後修飾が、天然型のものと同じ状態で発現されるという長所があり、リガンドとの結合性の解析などの生化学的な研究に用いるには、適切な手段といえる。しかし、発現量に難点があるため、X線結晶構造解析など、大量の精製タンパク質を必要とする場合には、哺乳動物細胞を用いた発現系はあまり有用ではない。

近年、バキュロウイルスの核多角体の主要構成タンパク質である、ポリヘドリンのプロモーターの下流に外来遺伝子を導入し、この組換え型ウイルスを昆虫細胞に感染させ、外来タンパク質を発現させることが可能となった¹⁴⁾⁻¹⁵⁾。この発現系の特徴として、哺乳動物細胞で発現させた場合と同様の翻訳後修飾が、天然型のタンパク質とほぼ同様に起こること、また、従来の哺乳動物細胞を用いた発現系に比べて極めて高収量で発現タンパク質が得られることなどが知られている。後述する、筆者らが作製したsTCRにおいても、アフリカミドリザル腎由来細胞COS-7を用いた発現系では、精製後の最終収量が

約50 $\mu\text{g/L}$ であった¹⁶⁾のに対し、シャクトリムシ由来細胞Tn-5を用いた発現系では、同じ精製段階を踏んだにも拘わらず、約1 mg/Lと培地あたりおよそ20倍高い収量で得られた。

3. sTCR作製の実際

以下では、sTCR作製の具体的な例として、筆者らの研究を中心に述べる。

これまでの研究で、ウシ β -ラクトグロブリン(β -LG)の119番目から133番目までのアミノ酸残基(p119-133)とマウスのMHCクラスII分子であるI-A^b分子との複合体を特異的に認識するCD4⁺Th1型細胞であるG1.19が樹立されている¹⁷⁾。G1.19由来のTCR $\alpha\beta$ 鎖の遺伝子は、既に明らかにされており、このG1.19由来のsTCRを構築し、解析に用いることによって、その特異的抗原である β -LG p119-133との相互作用の分子レベルでの解析、さらにはsTCRを用いた組織染色により、経口摂取された β -LGが抗原提示される部位や細胞を同定できると期待できる。そこで、ロイシンジッパー法を利用したsTCRヘテロ二量体を作製することにした。また、sTCR α 鎖のC末端に抗-ヒトc-mycモノクローナル抗体(mAb)が認識するエピトープ配列を接続し、発現タンパク質の検出が容易に行われるようにsTCRを設計した(図3)。すなわち、TCR α 鎖をコードしているcDNAのC領域下流に、249残基から成る塩基性ペプチドとc-mycのエピトープ配列、 β 鎖cDNAのC領域下流に、286残基から成る酸性ペプチドをコードする塩基配列を、Polymerase chain reaction (PCR)法によりそれぞれ導入した。sTCR α 鎖および β 鎖をコードするキメラDNAを得た後、それぞれをクローニングベクターpUC119にサブクローニングし、目的の配列が得られたことを確かめた。

*Autographa Californica*核多角体病ウイルス(AcNPV)を利用した、昆虫細胞を用いた発現系によりsTCRを作製するため、Life Technologies社のBAC-TO-BACシステムを用いた。作製したsTCR α 鎖および β 鎖遺伝子を、ドナープラスミドpFASTBACDUALのポリヘドリン、p10プロモー

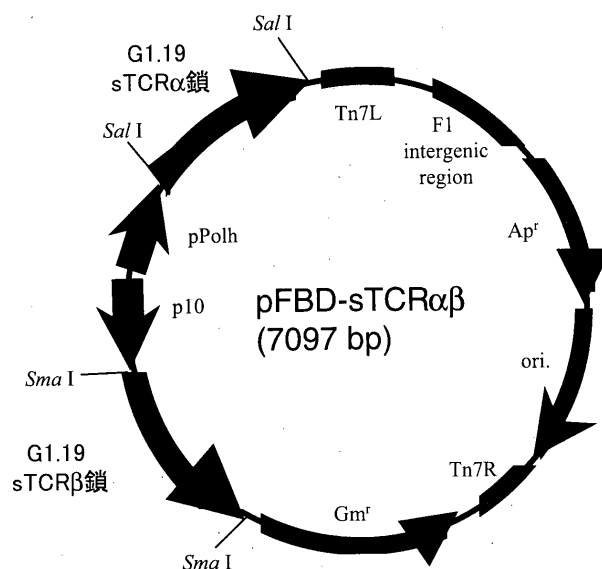
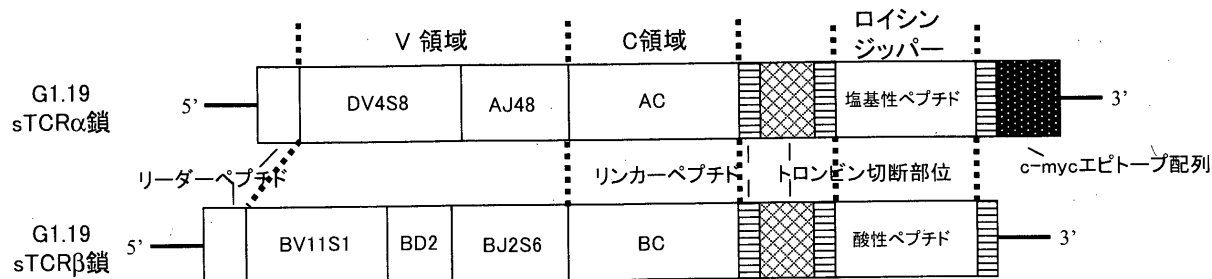


図3 ドナープラスミドベクターpFBD-sTCR $\alpha\beta$ の構造

ターの下流にそれぞれ導入し、組換え型ドナープラスミドpFBD-sTCR $\alpha\beta$ を得た(図3)。これを用いて、ヒートショック法により、DH10BACTMコンピテント大腸菌細胞の形質転換を行った。DH10BACTMは細胞内にヘルパープラスミド(pMON7124)の他、低コピー数mini-Fレプリコンとカナマイシン耐性遺伝子、ならびにlacZ α 遺伝子を持つ野生型バクミド(bMON14272)を含んでおり、このlacZ α 遺伝子のN-末端には、トランスポゾンTn7に対する結合部位(mini-attTn7)が存在している。一方、pFASTBACDUALは、両プロモーター下流域を含むmini-T7エレメントを持つので、pFBD-sTCR $\alpha\beta$ が導入されたDH10BACTM内では、ヘルパープラスミドにより、バクミドのmini-attTn7でトランスポジションが起こり、ポリヘドリン、p10両プロモーターならびにsTCR α 鎖、 β 鎖をコードするDNAがバクミド内に挿入され、組換え型バクミドが産生される。組換え型バクミドを含むDH10BACTMを青白

スクリーニングにより選択し、アルカリ-SDS法により高分子量のDNAを抽出した。sTCR α 鎖、 β 鎖をコードするDNAを含む組換え型バクミドの存在は、PCR法により確認した。このようにして得られた、目的の組換え型バクミドをヤトウガ由来細胞Sf-9に導入した。組換え型バクミドが導入されたSf-9細胞は、組換え型バキュロウイルスを産生し、培養上清中にウイルス粒子を放出する。ウイルス粒子を含む培養上清を回収後、Sf-9細胞によりさらに増幅し、プラークアッセイにて感染力価を決定した。sTCRの発現は、得られた組換え型バキュロウイルスをTn5細胞に感染させることで試みた。組換え型ウイルス感染後4日目の細胞培養上清を、抗-TCR β 鎖C領域mAb固定化カラムを用いてアフィニティー精製した後、非還元条件下で精製されたタンパク質のSDS-PAGEを行い、銀染色したところ、約86kDaに相当する位置にタンパク質が検出された。還元条件下では、およそ45kDa付近にブロードなバ

ンドが検出され、またこれらのバンドがともに抗-c-myc mAbを用いたウエスタンブロット解析でも検出されたことから、検出された86kDa、45kDaのバンドは、それぞれsTCR $\alpha\beta$ 、sTCR α 鎖の単量体であると考えられ、sTCRの分泌発現を確認できた。前述したように、発現量は培地 1 mlあたりおよそ 1 μ g程度と考えられ、大量発現と精製を行うことにより、TCR/pMHC相互作用解析および抗原提示部位や抗原提示細胞の同定に利用できると期待できた。

そこで我々は、まずはじめに、sTCRを標識し、マウスに β -LGを経口摂取させて組織染色に用いることで、抗原提示部位の同定に用いることを考えた。しかし、抗原-抗体反応などと比べて、TCRとpMHCの結合自体は非常に弱いものである。特に、sTCRの単量体においては、リガンドに対するアフィニティーが弱く、組織染色等の解析には適していないことが予想される。しかし、可溶化型のMHCを作製し、特定の抗原を結合させて四量体化した可溶化型pMHC四量体を用いて、ある抗原に特異的に反応するT細胞を検出できた、という報告がなされたことから¹⁸⁾、sTCR $\alpha\beta$ も多量体化することにより、リガンドに対する結合親和性(アビディティー)を増強することで克服できると考えられた。また実際に、可溶化型MHCを四量体化することで、単量体の可溶化型MHCよりもリガンドに対するアビディティーが飛躍的に向上したという報告もなされているので¹⁹⁾、これと同様の効果がsTCR $\alpha\beta$ 四量体においても期待できる。そこで、ビオチン-アビジン反応によるsTCR $\alpha\beta$ 四量体の構築を行った(図4)。具体的には、sTCR β 鎖の下流にビオチン化酵素Bir Aが認識する配列²⁰⁾を導入し、Sf-9細胞を用いて、ビオチン化配列を付加したsTCR $\alpha\beta$ (sTCR $\alpha\beta$ b)の分泌発現を行った。精製はsTCR $\alpha\beta$ の場合と同様に行い、SDS-PAGEに供した。銀染色と抗-c-myc抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、非還元条件下では、sTCR $\alpha\beta$ bと推定される約90kDaのバンドが観察された。一方、還元条件下では、銀染色においてはそれぞれTCR β 鎖、 α 鎖と推定される約52kDaと約42kDaの二本のバン

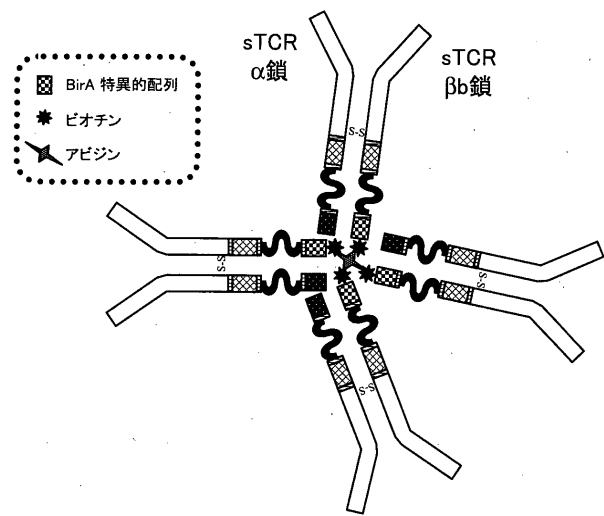


図4 sTCR $\alpha\beta$ b四量体の概念図

ドが検出された。また、ウエスタンブロットティングにおいて、sTCR α 鎖と推定される約40kDaのバンドが確認されたことから、sTCR $\alpha\beta$ bの分泌発現を確認することができた。

sTCR $\alpha\beta$ bの結合特異性を調べるため、以下の実験を行った。MHCクラスII分子であるI-A^b分子を発現させたp12細胞を抗原提示細胞とし、これとp119-133とともに、T細胞クローンG1.19をsTCR $\alpha\beta$ b存在下あるいは非存在下で培養したところ、G1.19のp119-133に対する増殖は、sTCR $\alpha\beta$ bの濃度依存的に顕著に抑制される現象が観察された。これは、sTCR $\alpha\beta$ bがp119-133/I-A^b複合体に結合することにより、G1.19細胞上のTCRが複合体に結合する機会が減少し、細胞に十分な刺激が与えられなかった結果、増殖応答が抑制されたためと考えられる。

次に、フローサイトメトリーによりsTCR $\alpha\beta$ bの結合特異性を評価した。p12細胞をp119-133存在下で培養することにより、p119-133/I-A^b複合体を細胞表面に提示させた。これにsTCR $\alpha\beta$ bを結合させ、蛍光標識した抗-TCR β 鎖C領域抗体で細胞を染色し、フローサイトメトリー解析に供した。その結果、p119-133の存在下で培養したp12細胞にのみ特異的なシグナルが観察され、sTCRがペプチド特異的にpMHC複合体と結合していることが示された。

これらの結果より、sTCRが生体内のTCRと同様に、ペプチド特異的にpMHC分子と結合できることが示された。このsTCRは、今後、リガンド間の相互作用の解析や、組織染色による抗原提示部位の同定など、様々な解析の有力なツールとなると期待される。

4. 今後の展望

ここまで述べたように、sTCRは食品アレルギーをはじめとした種々の免疫疾患の発症機構解明にあたり、物理化学的・生化学的解析を行う上で、有用であることが期待されている。

ごく最近、ヒトの悪性腫瘍において過剰発現しているp53ガン抑制タンパク質をターゲットにしたsTCRが開発され、診断に有用な腫瘍細胞の染色のみならず、実験モデルにおいてsTCRを投与することで、肺ガンの転移を抑制できた、との報告がなされた²¹⁾。

また、sTCRを免疫に用いることで、ワクチンとしてのsTCRを評価しようという試みがなされている²²⁾⁻²³⁾。McKeeverらは、D10マウス由来のsTCR-IgGキメラ分子でマウスの母親を免疫したところ、その子供のT細胞の特異的ペプチドに対する応答が抑制され、またT細胞上のTCRのレパトアが変化し、sTCRと同様のV領域を持つTCRを発現するT細胞の数が減少することを見いだした²²⁾。sTCRは免疫に用いることで、生体内と同じTCRとしてではなく、外来抗原として認識される。その結果、母親の体内でsTCRのV領域に特異的な抗体が産生され、その抗体が子供に移入し、免疫に用いたTCRと同様のV領域を持つT細胞の消滅が起きたと考えられる²²⁾。同様に、糖尿病モデルマウスの実験系において、sTCRの免疫により産生された抗-TCR抗体により、特異的T細胞の応答が妨げられ、糖尿病を防いだという報告もある²³⁾。これらの報告から、sTCRそのものが特定の免疫応答を制御する機能を持つワクチンとしての効果を持ち得ることが示唆された。すなわち、sTCRの経口投与により、特異的抗原に対する応答のみを選択的に抑制することが可能になり、食品アレルギーや自己免疫疾患な

どへの治療・予防法の一つになると期待される。

今後、sTCRを用いた様々な解析により、未だ不明な点が多い、食品抗原に対する免疫応答機構や、アレルギー、自己免疫疾患、ガンなどの発症機構が明らかになると期待され、それらの疾患に対する治療法や予防法の確率に大きく貢献するものと考えられる。

5. 謝 辞

ここで述べた筆者らの研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室において、同専攻食シグナル・生体統御系間相互作用（明治乳業）寄付講座の戸塚護助教授よりご指導を賜り、藤根清孝氏、山田晋也氏、岡部規子氏らのご協力のもとで成し遂げられたものである。この場を借りて深謝する。

また、ここに記載した成果の一部は、日本学術振興会からの科学研究費補助金により遂行された。併せて感謝申し上げる次第である。

6. 参考文献

- 1) Bentley, G.A. and Mariuzza, R.A., The structure of the T cell receptor. *Annual Review of Immunology*, 1996. 14: 563-590
- 2) Garcia, K.C., Teyton, L. and Wilson, I.A., Structural basis of T cell recognition. *Annual Review of Immunology*, 1999. 17: 369-397
- 3) Germain, R.N. and Margulies, D.H., The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology*, 1993. 11: 403-450
- 4) McMahan, R.H., Watson, L., Meza-Romero, R., Burrows, G.G., Bourdette, D.N. and Buenafe A.C., Production, characterization, and immunogenicity of a soluble rat single chain T cell receptor specific for an encephalitogenic peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278 (33): 30961-30970
- 5) Molloy, P.E., Harris, W.J., Strachan, G., Watts, C. and Cunningham, C., Production of soluble single-chain T-cell receptor fragments in *Escherichia coli* trxB mutants. *Molecular Immunology*, 1998. 35: 73-81
- 6) Willcox, B.E., Gao, G.F., Wyer, J.R., O'Callaghan, C.A., Boulter, J.M., Jones, E.Y., Van Der Merwe, P.A., Bell, J.I. and Jakobsen, B.K., Production of soluble $\alpha\beta$ T-cell receptor heterodimers suitable for

- biophysical analysis of ligand binding. *Protein Science*, 1999. 8: 2418-2423
- 7) Golden, A., Khandekar, S.S., Osburne, M.S., Kawasaki, E., Reinherz, E.L. and Grossman, T.H., High-level production of a secreted, heterodimeric $\alpha\beta$ murine T-cell receptor in *Escherichia coli*. *Journal of Immunological Methods*, 1997. 206: 163-169
 - 8) Chang, H-C., Bao, Z-Z, Yao, Y., Tse, A.G.D., Goyarts, E.C., Madsen, M., Kawasaki, E., Brauer, P.P., Sacchettini, J.C., Nathenson, S.G. and Reinherz, E.L., A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: Application to expression of α and β T-cell receptor extracellular segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. 91: 11408-11412
 - 9) Garcia, K.C., Tallquist, M.D., Pease, L.R., Brunmark, A., Scott, C.A., Degano, A., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A. and Teyton, L., $\alpha\beta$ T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: Affinity measurements and crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. 94: 13838-13843
 - 10) Aydtung, M.K., Roark, C.L., Yin, X., Wands, J.M., Born, W.K. and O'Brien, R.L., Detection of cell surface ligands for the $\gamma\delta$ TCR using soluble TCRs. *The Journal of Immunology*, 2004. 172: 4167-4175
 - 11) Gakamsky, D.M., Luescher, I.F. and Pecht, I., T cell receptor-ligand interactions: A conformational preequilibrium or an induced fit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(24): 9063-9066
 - 12) Kieke, M.C., Sundberg, E., Shusta, E.V., Mariuzza, R.A., Wittrup, K.D. and Kranz, D.M., High affinity T cell receptors from Yeast Display Libraries block T cell activation by superantigens. *The Journal of Molecular Biology*, 2001. 307: 1305-1315
 - 13) Shusta, E.V., Holler, P.D., Kieke, M.C., Kranz, D.M. and Wittrup, K.D., Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nature Biotechnology*, 2000. 18: 754-759
 - 14) Miyajima, A., Schreurs, J., Otsu, K., Kondo, A., Arai, K. and Maeda, S., Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3. *Gene*, 1987. 58: 273-281
 - 15) Luckow, V.A., *Insect Cell Expressing Technology*. In: Cleland, J.L., Craik, C.S., Eds. Protein Engineering: Principles and Practice, 1996, John Wiley & Sons: New York.
 - 16) Amano, M., Totsuka, M., Fujine, K., Yamada, S. and Kaminogawa, S., Expression of a soluble alpha-beta heterodimeric T cell receptor in animal cells. *Animal Cell Technology; Challenges for the 21st century*, 1999. 99-103
 - 17) Totsuka, M., Furukawa, S., Sato, E., Ametani, A. and Kaminogawa, S., Antigen-specific inhibition of CD4⁺ T-cell response to beta-lactoglobulin by its single amino acid-substituted mutant form through T-cell receptor antagonism. *Cytotechnology*, 1997. 25: 115-126
 - 18) Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J. and Davis, M.M., Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996. 274: 94-96
 - 19) Crawford, F., Kozono, H., White, J., Marrack, P. and Kappler, J., Detection of antigen-specific T cells with multivalent soluble class II-MHC covalent peptide complexes. *Immunity*, 1998. 8: 675-682
 - 20) Schatz, P.J., Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 1993. 11: 1138-1143
 - 21) Card, K.F., Price-Schiavi, S.A., Liu, B., Thomson, E., Nieves, E., Belmont, H., Builes, J., Jiao, J., Hernandez, J., Weidanz, J., Sherman, L., Francis, J., Amirkhosravi, A. and Wong, H.C., A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2004. 53(4): 345-357
 - 22) McKeever, U., Khandekar, S., Jesson, M., Newcomb, J., Gregory, P., Naylor, J., Haskins, K. and Jones, B., Maternal immunization with a soluble TCR-Ig chimeric protein: long term, Vb8 family-specific suppression of T cells by maternally transferred antibodies. *Journal of Immunology*, 1997. 159: 5936-5945
 - 23) McKeever, U., Khandekar, S., Newcomb, J., Naylor, J., Gregory, P., Brauer, P., Jesson, M., Bettencourt, B., Burke, E., Alderson, A., Banerji, J., Haskins, K., and Jones, B., Immunization with soluble BDC 2.5 T cell receptor-immunoglobulin chimeric protein: antibody specificity and protection of nonobese diabetic mice against adoptive transfer of diabetes by maternal immunization. *Journal of Experimental Medicine*, 1996. 184: 1755-1768

(あまの まほ 生活科学科)

(かみのがわ しゅういち 日本大学生物資源科学部)